

합성 향균제를 대체하기 위한 천연물질의 향균 효과

조춘구, 김봉남, 홍세흠, 한창규*

승실대학교 환경·화학공학과, 동아제약 화장품연구소*

The Antimicrobial Effects of Natural Aromas for Substitution of Parabens

Choon-Koo Zhoh, Bong-Nam Kim, Se-Heum Hong, Chang-Giu Han*

Department of Environmental & Chemical Engineering, Soongsil University

Donga Medicine Dermal Research Institute*

요 약

화장품 향균제로 사용되는 합성물질인 paraben과 천연물질인 aroma oil의 향균력을 비교하였다. Aroma oil은 pine, rosemary, lemon, eucalyptus와 paraben은 methylparaben, butylparaben을 사용하였으며 각 농도는 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0wt%으로 하였다. 대상 균주는 그람양성균인 *Staphylococcus aureus*(ATCC No. 6538), *Bacillus subtilis*(ATCC No. 6633)와 그람음성균인 *Escherichia coli*(ATCC No. 8739), *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC No. 9027)을 사용하였으며, 향균력은 disk paper method와 broth dilution method로 측정하였다. Aroma oil과 paraben의 향균력은 그람음성균보다 그람양성균에 대하여 우수하게 나타났으며, aroma oil이 paraben보다 높은 향균효과를 보였다. Aroma oil은 eucalyptus, lemon, pine, rosemary 순으로 향균력이 높게 나타났으며, butylparaben이 methylparaben보다 우수하게 나타났다. Rosemary와 pine을 각각 단독으로 사용했을때보다 3/1의 비율로 혼합하였을 때 향균력이 더욱 우수하게 증가하는 상승효과를 나타내었다.

ABSTRACT

Aroma oils extracted from the natural material have antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, and preservative effect. The preservative efficacy testing between aroma oils and parabens as an artificial preservative had been performed and then it had been suggested that aroma oil was possible to apply to the cosmetics. Aroma oils were pine, rosemary, lemon and eucalyptus, and parabens were methylparaben, butylparaben. Antiseptic concentrations of aroma oils and parabens having 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0wt% were tested respectively. *Escherichia coli*(ATCC No. 8739), *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC No. 9027) which are gram-negative and *Staphylococcus aureus* (ATCC No. 6538), *Bacillus subtilis*(ATCC No. 6633) which are gram-positive were used as the test organisms. Disk paper and broth dilution methods were used as the methods of preservative efficacy testing. The antibacterial activity of aroma oils and parabens for gram-positive were better than that for gram-negative. For the antibacterial activity aroma oils were better than parabens. Among the aroma oils, rosemary and pine having superior antibacterial activity were selected and blended to illuminate if there is any synergy. There was synergical effect and optimum ratio of aroma blend is 3 : 1(rosemary : pine) in this study.

1. 서론

화장품의 제형은 미생물로부터 오염되기 쉽기 때문에 보존상의 문제점을 해결하기 위하여 방부제를 사용한다. ¹⁻²⁾ 방부제가 모든 미생물에 대하여 방부효과가 있는 것은 아니지만, 화장품을 오염시키는 미생물의 종류와 오염정도를 확인 할 필요가 있다. 오염 미생물의 종류가 다양할수록 단일 방부제로서는 미생물의 생육을 효과적으로 저해하기가 매우 어렵기 때문에 방부제를 혼합하여 사용하는 것이 미생물에 대한 생육저해를 향상시킬 수 있다. ³⁻⁵⁾

일반적으로 방부제의 기능은 두 가지로 분류된다. 하나는 미생물 증식을 억제하고 신진대사를 저해하여 발육을 못하게 하는 정균작용(bacteriostatic action)과 다른 하나는 미생물을 완전히 사멸시켜 다시는 재생하지 못하도록 하는 살균작용(bacteriocidal action)으로

구분할 수 있다.⁶⁻⁷⁾ 방부제가 살균 및 방부 기능을 보이는 것은 세균이나 진균의 세포막을 파괴하여 사멸시키기 때문이다. 미생물 세포막은 지질과 단백질로 구성되어 있는데, 방부제는 세포막을 파괴함으로써 유기물들이 세포 내부로 들어갈 수 있게 만든다. 이때 세포 내부의 물질들이 세포 밖으로 유출되어 세포 내부의 환경이 바뀌게 되고 세포가 파괴되어 미생물이 사멸된다. 살균 및 방부효과만을 위하여 방부제를 다량으로 사용할 경우 화장품의 안정성 및 피부자극 등이 유발될 수 있기 때문에 최소량으로 최대의 항균력을 나타낼 수 있는 방부체계를 선택하는 것은 매우중요하다.⁸⁻¹⁰⁾

Aroma oil은 박테리아, 곰팡이, 효모에 대한 항균제로서 오랜 기간 동안 미용과 질병 치료 및 예방, 화장품 분야에 사용¹¹⁻¹⁵⁾되어 왔으며 정신적으로 안정을 주며 오일의 유효 성분은 피부에 침투하여 피부의 노폐물 제거, 노화방지, 재생효과, 살균, 청정작용, 신진 대사촉진 등에 효과가 있다.¹⁶⁻¹⁹⁾ 따라서 aroma oil을 화장품에 사용할 경우 기존 합성방부제에서 나타날 수 있는 품질의 안정성, 피부자극성 등을 개선시킬 수 있고, aroma oil의 강한 천연 향이 기존의 합성향이 갖고 있는 여러가지 문제점을 해결할 수 있는 이중의 효과를 기대할 수 있다.

본 연구에서는 항균, 항바이러스, 항염증, 방부성질 등을 지닌 천연 물질 aroma oil과 합성물질인 paraben의 항균력을 단일방부실험과 혼합방부실험을 통하여 항균력을 보다 향상시키고 광범위하게 사용할 수 있는 효과적인 방부체계로서 이용가능성을 제시하고자 하였다. 실험에 사용된 균주는 공기 중에 흔히 존재하며 화장품의 주요오염원이 되는 그람음성균인 *E. coli*, *P. aeruginosa*와 그람양성균인 *S. aureus*, *B. subtilis*을 사용하였다.

2. 실험 및 방법

2.1. 실험재료

2.1.1. 균주

본 실험에 사용한 균주는 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* 으로 한국중균협회(KFCC)로부터 구입하여 사용하였다.

2.1.2. 배지

증류수 1000ml에 nutrient agar(bacto beef extract:3g, bacto peptone:8g, bactor agar: 15g)

23g을 용해하여 $1\text{kg}/\text{m}^3_{\text{gauge}}$, 121°C 에서 15분간 autoclave에서 멸균한 후 45°C 로 냉각하여 petri dish에 각각 15ml씩 주입하였다.

2.1.3. 방부제

천연방부제로는 aroma oil 중 pine, rosemary, lemon, eucalyptus(Aroma newtech, U.S.A)와 합성방부제로는 methylparaben(Eastman, U.S.A), butylparaben(Eastman, U.S.A)을 사용하였고, 각각의 방부제 농도는 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0wt%로 하였다. 천연방부제를 용해하기 위해서 세균의 활성이 거의 없는 POE(20) sorbitan monostearate (Tween 60, ICI, U.S.A)를 사용하였다.

2.1.4. 배양조건

배양액은 $1\text{kg}/\text{cm}^3_{\text{gauge}}$, 121°C 에서 15분간 autoclave에서 멸균시켰다. 균체는 동결 건조된 균을 holding loop를 이용하여 고체 배지에 균을 스크래치한 후 30°C 에서 24시간 배양기에서 배양하였다. 250ml 삼각플라스크에 액체 배지를 100ml 씩 넣고 멸균시킨 후 고체 배지에서 자란 각 균들로부터 단일 colony를 취해서 액체 배지에 넣은 후 30°C 에서 24시간 진탕배양기에서 배양하였다. 균주의 성장은 UV/VIS Spectrometer (Spectronic 21, Milton Roy Co., U.S.A)를 이용하여 파장 600nm에서 흡광도를 측정하여 활성이 가장 우수한 시간대의 균주를 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1 Disk Paper Method

배양된 각 균주의 단일 colony를 취하여 멸균된 액체 배지 10ml에 접종하여 30°C 에서 24시간 동안 진탕배양조에서 배양하여 활성화시킨 후 600nm에서 흡광도를 측정하여 균을 일정하게 조절하였다. 액체 배지의 균을 $100\mu\text{l}$ 씩 취해서 고체 배지에 spreader를 이용하여 균일하게 도말 한 후 각 방부제를 멸균된 8mm filter paper disk를 plate 표면 위에 농도별로 $30\mu\text{l}$ 씩 주입하여 흡수시킨 후 30°C 에서 48시간 동안 배양기에서 배양한 후 filter paper disk 주위의 clearzone의 직경크기를 측정하였다.

2.2.2. Broth Dilution Method ²⁰⁾

배양된 각 균주의 단일 colony를 취해 멸균된 액체 배지 10ml에 접종한 후 30°C 에서

24시간 동안 진탕배양기에서 배양하여 활성화시켰다. 균주의 생육정도를 알아보기 위하여 spectrophotometer를 사용하였다. 파장 600nm에서 흡광도를 통하여 균을 일정하게 조절한 후 배양액을 100배 희석하였다. 이것을 1ml씩 취해서 멸균된 배양액 9ml가 담긴 culture tube에 넣고 30℃에서 24시간 동안 진탕배양기에서 배양하였다. 24시간 후 균이 담긴 culture tube에 각 방부제를 농도별로 10⁻⁸ 까지 희석한 후 희석된 접종원을 100 μ l씩 멸균된 고체 배지에 도말하였다. 또한 방부제를 희석한 것과 희석하지 않은 것을 도말한 후 petri dish를 밀봉하여 30℃에서 72시간 동안 배양기에서 배양한 후 colony의 수를 계수하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Disk Paper Method

3.1.1. Aroma oil과 Paraben의 항균효과

균주를 30℃의 배양조에서 48시간 보관 후 disk paper method을 사용하여 그람양성균 (*S. aureus*, *B. subtilis*)과 그람음성균(*E. coli*, *P. aeruginosa*)에 대한 aroma oil(pine, rosemary, lemon, eucalyptus)과 paraben(methylparaben, butylparaben)의 항균효과를 clearzone size로 측정하여 그 결과를 Fig. 1~6에 나타내었다. 시료의 농도는 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0wt%으로 하였다. Fig. 1, 2, 3, 4과 Fig. 5, 6은 각각 pine, rosemary, lemon, eucalyptus와 methylparaben, butylparaben에 관한 그림이다.

Fig. 1은 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*에 대한 clearzone size를 pine의 농도변화에 따라 나타낸 그림이다. 농도가 0wt%에서 1.0wt%로 증가함에 따라 clearzone size는 8mm에서 16.8mm으로 증가함을 알 수 있는데, 이것은 pine의 농도가 증가함에 따라 세포막에 대한 pine의 투과량이 증가하여 세포의 성장속도를 억제시킴으로서 세포들이 더욱 많이 사멸된 결과로 볼 수 있다. 농도 1.0wt%에서 그람양성균인 *S. aureus*, *B. subtilis*의 clearzone size는 16.7mm와 17.0mm, 그람음성균인 *E. coli*, *P. aeruginosa*은 15mm, 16.0mm으로 그람양성균이 그람음성균보다 크게 나타남을 볼 수 있는데, 이것은 그람양성균의 세포벽은 그람음성균의 세포벽보다 비교적 약한 구조로 구성되어 있어 pine의 long chain aldehyde가 그람양성균의 세포막에 더욱 흡착 및 투과하여 세포를 사멸시켜 나타난 것으로 생각된다.

Fig. 2, 3, 4는 rosemary, lemon, eucalyptus에 관한 그림으로 Fig. 1의 pine과 유사한 결과를 나타내고 있으며 동일한 방법으로 해석할 수 있다. Fig. 1, 2, 3, 4에서 농도 0.2wt%에서 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*에 대한 clearzone size의 값은 pine은 12~13.2mm, rosemary는 12.5~14.0mm, lemon은 11~112.5mm, eucalyptus는 11.5~12.9mm으로 clearzone size의 크기는 eucalyptus, lemon, pine, rosemary 순으로 증가함을 알 수 있다. 이것은 rosemary가 다른 oil보다 물리적, 화학적 특성상 두 균주의 세포막에 쉽게 흡착 또는 투과하기 때문인 것으로 생각된다.

Fig. 5, 6은 각각 methylparaben과 butylparaben에 관한 그림이다. 0.2wt%에서 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*에 대한 clearzone size 값은 methylparaben이 8.7, 9.0, 9.5, 9.5mm이고, butylparaben은 9.5, 10.2, 10.4, 10.4mm으로 나타났다. Fig. 1, 2, 3, 4에 나타난 aroma oil의 clearzone size보다는 작지만 유사하게 paraben의 농도가 증가함에 따라 clearzone 크기가 증가하는 경향을 보이고 있음을 알 수 있다. 이것은 paraben의 OH기가 균주의 세포막에 흡착하여 세포질 구성 성분을 용출시켜 투과막을 파괴시킨 결과라고 생각된다.²¹⁾ 그리고 butylparaben의 clearzone size가 methylparaben의 값보다 크게 나타났는데 이것은 알킬기 길이가 비교적 긴 butylparaben이 세포막에 보다 쉽게 용해되기 때문인 것으로 추측된다.

Fig. 1~6의 결과를 통하여 그람양성균(*S. aureus*, *B. subtilis*)과 그람음성균(*E. coli*, *P. aeruginosa*)에 대한 항균력은 천연물질인 aroma oil이 합성물질인 paraben보다 우수함을 알 수 있으며, aroma와 paraben은 모두 그람음성균보다 그람양성균에서 보다 큰 효과를 나타낸다고 할 수 있다.

3.1.2. Rosemary와 Pine 혼합물의 상승효과

단독 사용 시 항균효과가 가장 우수한 rosemary와 pine을 혼합하여 혼합비율에 따른 항균력의 효과를 알아보았다. Fig. 7은 시료 농도가 0.2wt%인 rosemary와 pine의 혼합비(rosemary : pine)를 1:0, 3:1, 1:1, 1:3, 0:1으로 혼합했을 때 그람양성균과 그람음성균에 대한 clearzone size 변화를 나타낸 그림이다. Rosemary와 pine을 혼합하여 사용했을 때의 clearzone size 값이 단독으로 사용했을 때보다 증가하였음을 알 수 있으며, 3:1의 혼합비에서 clearzone size 값은 19.2mm로 가장 크게 나타났다. 이것은 rosemary의 구성성분인 monoterpenes, borneol, boryl acetate와 pine의 구성성분인 cineol, pinene, limonene 등이 상호간 작용하여 항균성이 상승한 것으로 추측된다.

3.2. Broth Dilution Method

3.2.1. Aroma oil과 Paraben의 항균효과

시료를 30℃의 진탕배양조에서 10일간 보관하면서 broth dilution method를 사용하여 시간 경과에 따라 그람양성균인 *S. aureus*, *B. subtilis*와 그람음성균인 *E. coli*, *P. aeruginosa*에 관한 총 균수의 변화로 aroma oil과 paraben의 항균효과를 측정하여 그 결과를 Fig. 8~14에 나타내었다. 항균제의 농도는 disk paper method의 경우와 동일한 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0wt%으로 하였다. Fig. 8, 9, 10, 11과 Fig. 12, 13은 각각 pine, rosemary, lemon, eucalyptus와 methyl paraben, butylparaben에 관한 그림이다.

Fig. 8은 pine을 사용하여 시간 변화에 따른 총 균수 변화를 나타낸 그림이다. Pine 농도가 0, 0.1wt%인 경우 전체 균수는 거의 변화가 없거나 비교적 완만히 감소하는 반면, 농도가 0.2wt% 이상에서는 균수의 감소율이 크게 증가함을 알 수 있다. 10일 후 pine의 농도가 0.2wt%일때 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*에 대한 총 균의 사멸률은 각각 81.0%, 75.8%, 85.9%, 82.5%이고, pine의 농도가 1.0wt%인 경우 각 균의 사멸률은 90.3%, 87.4%, 94.4%, 95.6%으로 pine의 항균효과는 그람음성균보다 그람양성균에서 우수한 항균력을 보이므로 농도가 0.2wt%만 되어도 항균력이 크게 나타난다고 할 수 있다. 이것은 disk paper method에서 설명한 것처럼 항균제가 균주의 세포막에 흡착하여 세포질 구성 성분을 용출 시켜 세포내의 정상적인 신진 대사를 저해한 결과때문이라고 생각되며, 또한 그람양성균의 세포막 강도는 그람음성균에 비하여 비교적 약하기 때문에 그람양성균에서 사멸률이 크게 나타난 것으로 보인다.

Fig. 9, 10, 11은 각각 rosemary, lemon, eucalyptus에 관한 그림으로 Fig. 8의 pine과 유사한 거동을 나타내고 있으며 동일하게 설명될 수 있다.

Fig. 12, 13은 각각 methylparaben과 butylparaben에 관한 그림이다. Paraben의 사멸률은 50~70wt%으로 Fig. 8~11의 aroma oil의 사멸률 80~90wt%보다 낮으며 또한 전체 균수의 감소변화률도 매우 낮게 나타남을 알 수 있다. 따라서 aroma oil과 같은 항균효과를 나타내기 위한 paraben의 농도는 최소한 aroma oil의 2배인 0.4wt% 이상되어야 한다고 판단된다. 이것은 균주의 세포막에 대한 methylparaben과 butylparaben의 침투 및 확산능이 aroma oil보다 떨어지기 때문인 것으로 생각된다. Methyl paraben 농도가 1.0wt%에서 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*에 대한 각각의 사멸률은 70.2%, 70.9%, 71.3%, 72.4%이며, butylparaben의 경우에는 73.5%, 74.2%, 73.5%, 75.0% 으로 butylparaben의 항균력이 methylparaben보다 우수하다고 볼 수 있다. 이것은

methylparaben보다 친유성이 큰 butylparaben이 균주 세포의 지방산에 대한 산화성 인산화 반응을 저해하여 미생물의 정상적인 대사를 방해한 결과라고 생각된다.

3.2.2. Rosemary와 Pine 혼합물의 상승효과

단독 사용 시 항균효과가 가장 우수한 rosemary와 pine을 혼합하여 혼합비율에 따른 항균력의 효과를 알아보았다. Fig. 14는 10일 경과 후 시료 농도가 0.2wt%인 rosemary와 pine의 혼합비(rosemary : pine)를 1:0, 3:1, 1:1, 1:3, 0:1으로 혼합했을 때 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*에 대한 균 수의 변화를 나타낸 그림이다.

Rosemary와 pine을 단독으로 사용하였을 때 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*의 사멸률이 각각 80.6%, 81.9%, 82.5%, 84.9%와 75.8%, 78.0%, 80.1%, 83.1%이지만 rosemary와 pine을 혼합함에 따라서 사멸률은 점점 증가하여 이들의 혼합비가 3:1에서 사멸률은 93.4%, 95.8%, 97.4%, 98.4%로 가장 높게 나타났다. 따라서 rosemary와 pine을 혼합하여 사용함으로써 항균력 상승효과를 기대할 수 있다.

4. 결론

그람음성균인 *E. coli*, *P. aeruginosa*와 그람양성균인 *S. aureus*, *B. subtilis*에 대한 aroma와 paraben의 항균력 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 그람양성균과 그람음성균 모두에 대하여 aroma의 항균력은 적은 농도에서도 paraben보다 우수하게 나타났으며, 그람음성균보다 그람양성균에서 보다 좋은 효과를 보였다. Aroma oil의 항균력은 eucalyptus, lemon, pine, rosemary순으로 우수하였으며, paraben의 경우에는 methylparaben보다 butylparaben의 항균력이 높게 나타났다. Aroma oil을 단독으로 사용하였을 때보다 혼합하여 사용한 경우가 높은 항균력을 보였으며, 특히 rosemary와 pine을 3:1의 비율로 혼합사용시 최대의 항균력을 나타내었다.

5. 참고문헌

1. Brannan D. K. and Dille, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1990**, *56*, 1476~1479.
2. Beucht, L. R., *J. Food P.*, **1983**, *46*, 135~141.
3. Morse, L.J., H.L. Willams, F.P. Grenn, Jr. EE Eldridge and J.R. Rotta.N., *J. Med.*, **1967** *277*, 472~473.
4. Noble, W.C. and J.A. Savin., *Pseudomonas aeruginosa. Lancet*, **1966**, *1*, 347~349.
5. Wilson, L.A. and D.G. Ahearn, *Ophthalmol.*, **1977**, *84*, 112~119.
6. 김기호, *약품미생물학*, 진명사, **1979**, 89~95.
7. Wedderburn, *Adv. pharm, Soc.*, **1964**, *1*.
8. 강신성의 5, *교양 생물학*, 아카데미서적, **1997**, 54~55.
9. Y. Naves, *Perfums France*, **1935**, *13*, 273~284.
10. Orth, D. S., *Cosm. & Toil.*, **1989**, *104(4)*, 49~57.
11. F. K. Oldham, F. E. Kelsey and E. M. K. Geiling, *Essentials in Pharmacology*, **1951**, Lippincott, Philadelphia.
12. R. S. Potter., *Flavours*, **1939**, *2*, 7~12.
13. T. McLachlen, *Soap perfum. Cosmet.*, **1946**, *19*, 666~672.
14. D. I. Macht and W. M. Kunkel, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1920**, *18*, 68~90.
15. 조춘구, 한창규, *대한화장품학회지*, **1999**, *25*, 87~99
16. Acenzi JM, *Handbook of Disinfectants and Antiseptics*, Marcel Dekker, New York, **1996**.
17. R. Tisserand, *The art of aromatherapy*, **1978**.
18. P. Davis, *Aromatherapy*, **1988**.
19. P. Purohit and T .R. Kapsner, Aveda Corporation, Minneapolis, Minnesota, USA, *109*, **1994**.
20. Ronald M. Atlas., *Principles of microbiology*, Mosby, **1994**, 53~54.
21. 고영진외 20, *미생물학 실험*, 월드사이언스, **2000**.
21. Silver, S. and L. Wendt., *J. Bacteriol.*, **1976**, *93*, 560~570.

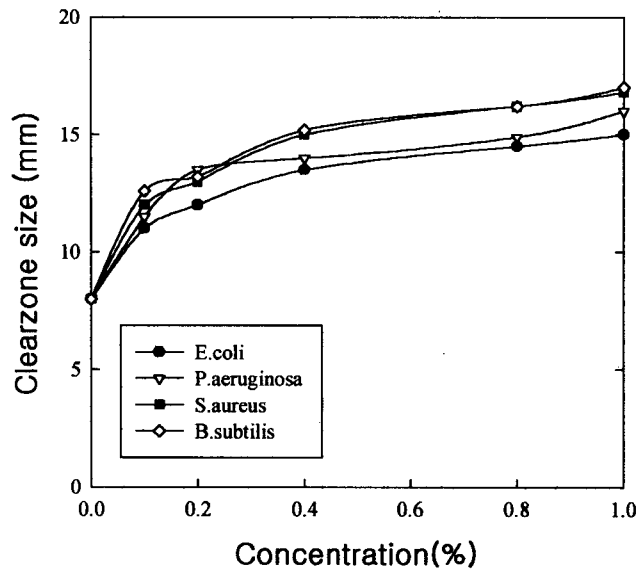


Fig. 1. The clearzone size of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* after applying pine.

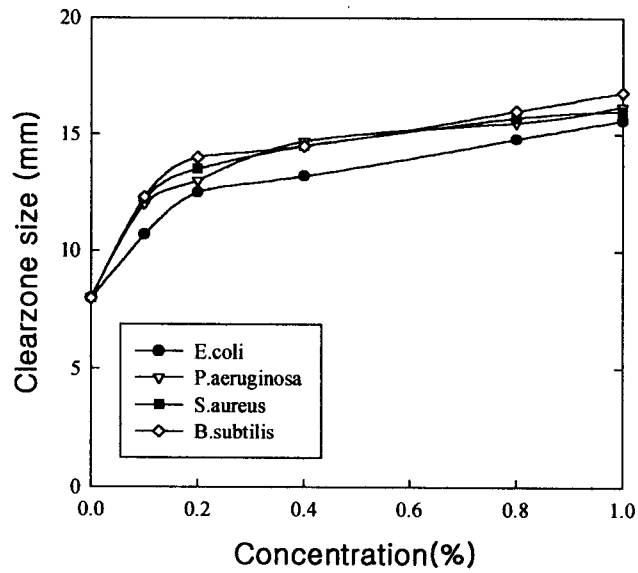


Fig. 2. The clearzone size of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* after applying rosemary.

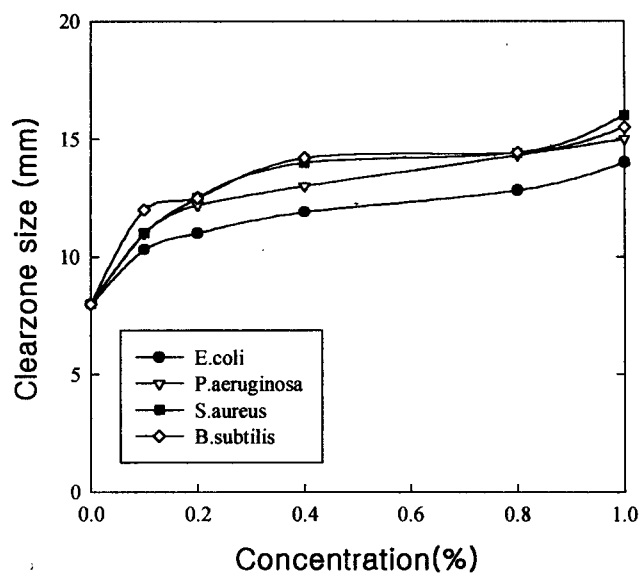


Fig. 3. The clearzone size of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* after applying lemon.

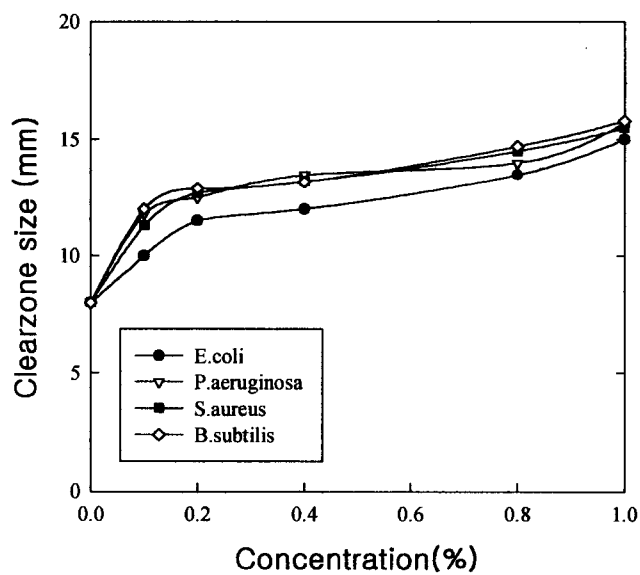


Fig. 4. The clearzone size of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* after applying eucalyptus.

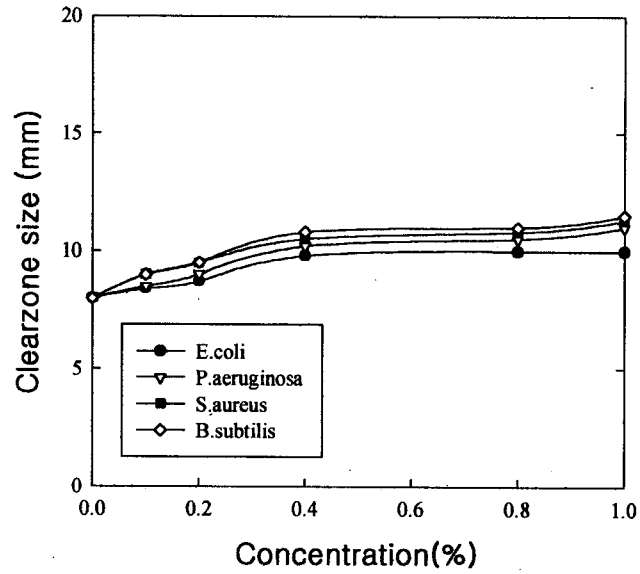


Fig. 5. The clearzone size of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* after applying methylparaben.

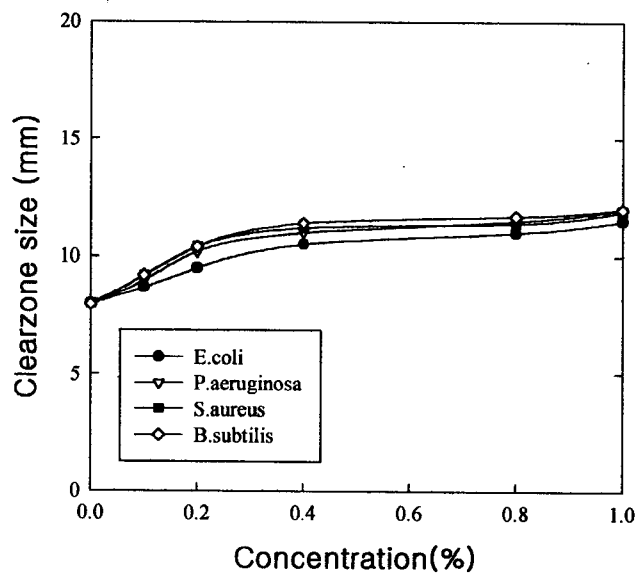


Fig. 6. The clearzone size of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* after applying butylparaben.

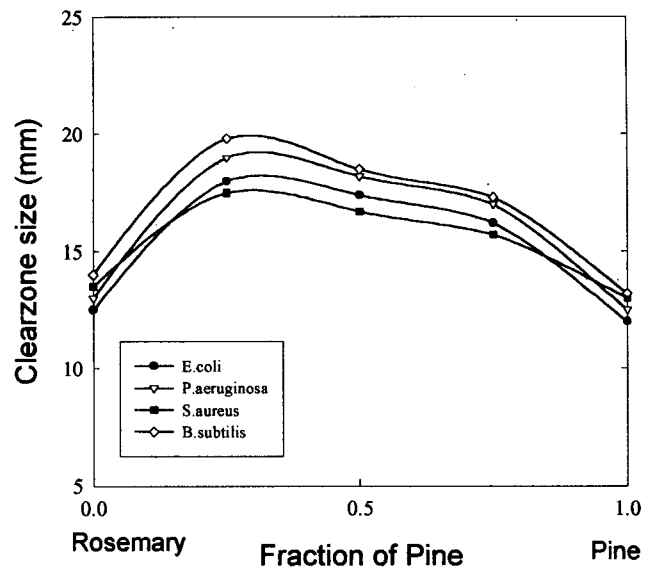


Fig. 7. The clearzone size of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* for the mixtures of rosemary and pine.

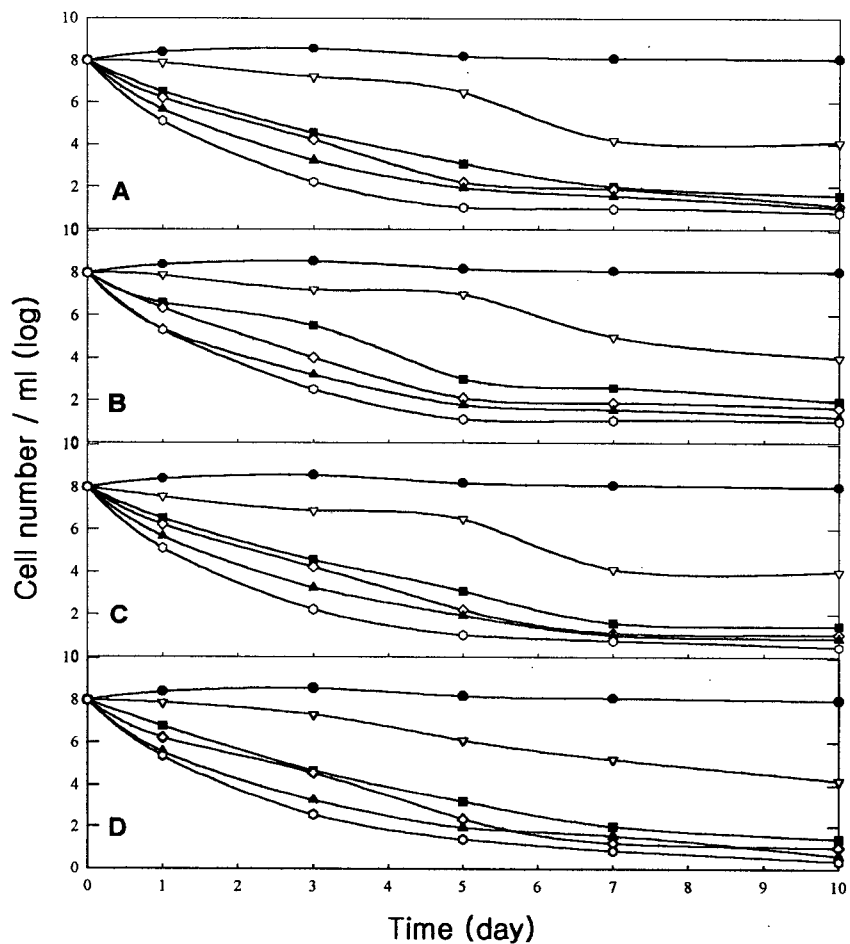


Fig. 8. The colony form unit (cfu) of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* for pine using broth dilution method. (A:*E.coli*, B:*P.aeruginosa*, C:*S.aureus*, D:*B.subtilis*, ●:0.0wt%, ▽:0.1wt%, ■:0.2wt%, ◇:0.4wt%, ▲:0.8wt%, ○:1.0wt%).

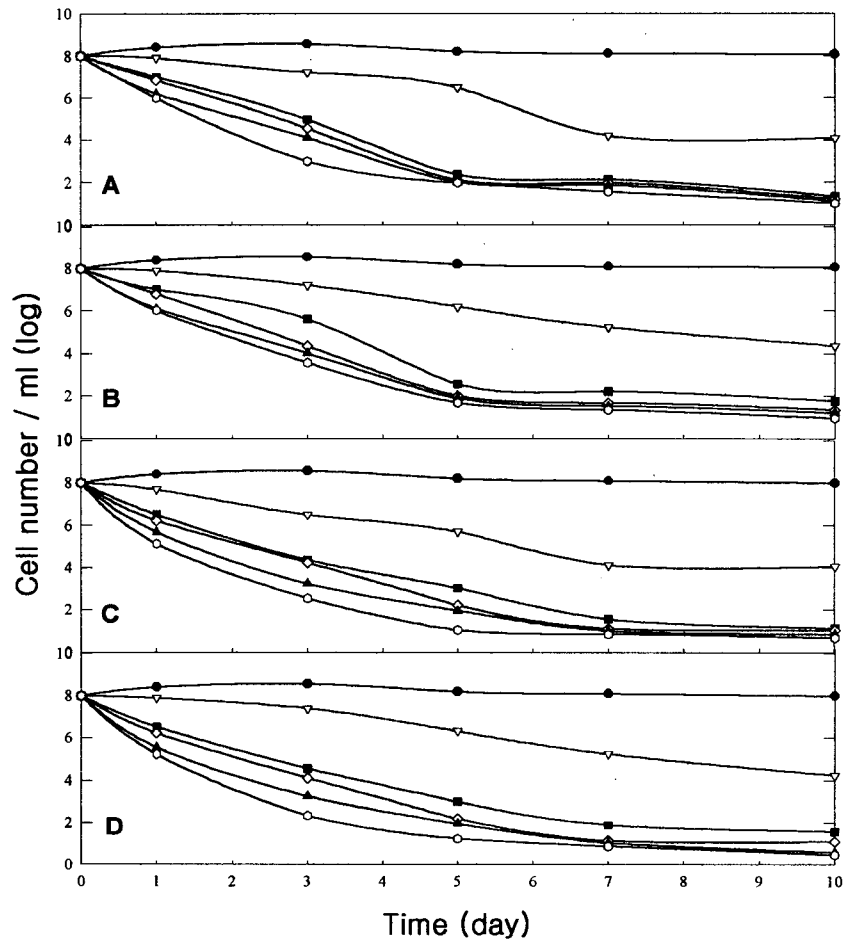


Fig. 9. The colony form unit (cfu) of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* for rosemary using broth dilution method. (A:*E.coli*, B:*P.aeruginosa*, C:*S.aureus*, D:*B.subtilis*, ●:0.0wt%, ∇:0.1wt%, ■:0.2wt%, ◇:0.4wt%, ▲:0.8wt%, ○:1.0wt%).

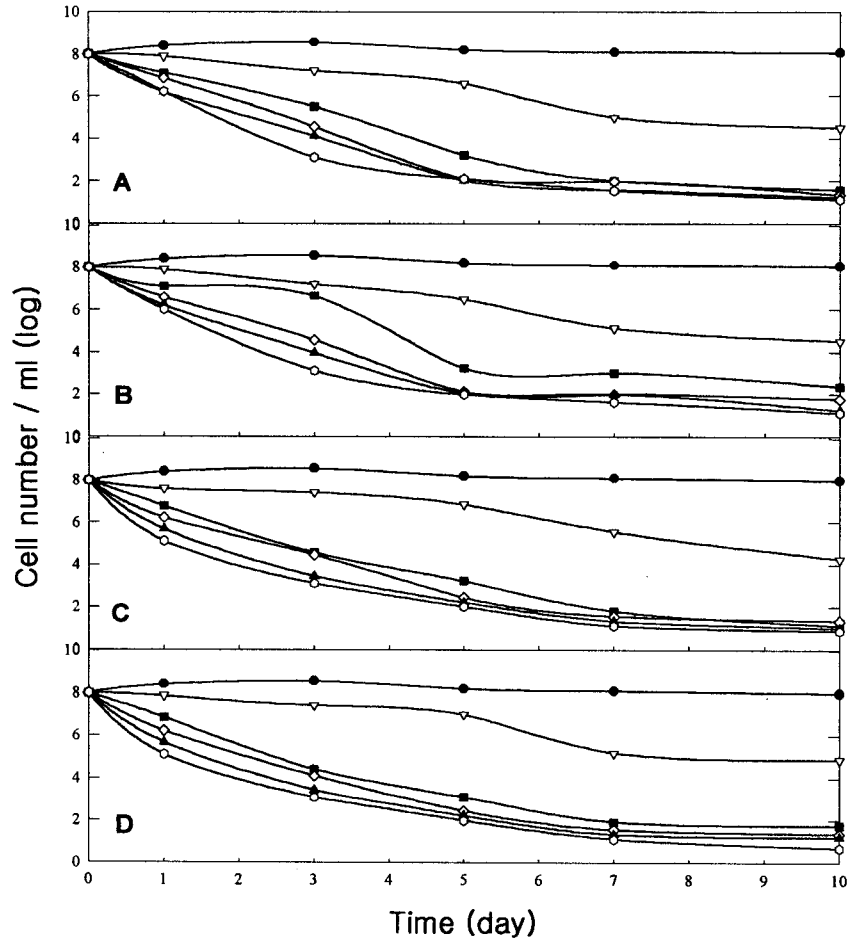


Fig. 10. The colony form unit (cfu) of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* for lemon using broth dilution method. (A:*E.coli*, B:*P.aeruginosa*, C:*S.aureus*, D:*B.subtilis*, ●:0.0wt%, ∇:0.1wt%, ■:0.2wt%, ◇:0.4wt%, ▲:0.8wt%, ◻:1.0wt%).

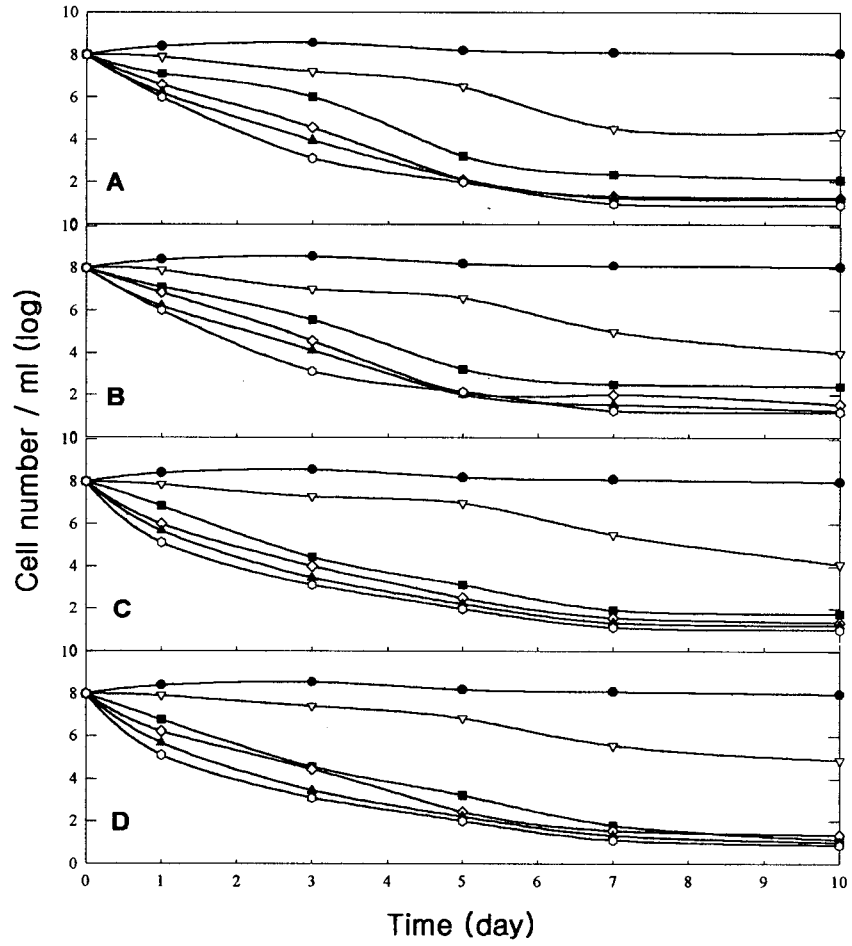


Fig. 11. The colony form unit (cfu) of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* for eucalyptus using broth dilution method. (A:*E.coli*, B:*P.aeruginosa*, C:*S.aureus*, D:*B.subtilis*, ●:0.0wt%, ▽:0.1wt%, ■:0.2wt%, ◇:0.4wt%, ▲:0.8wt%, ⬡:1.0wt%).

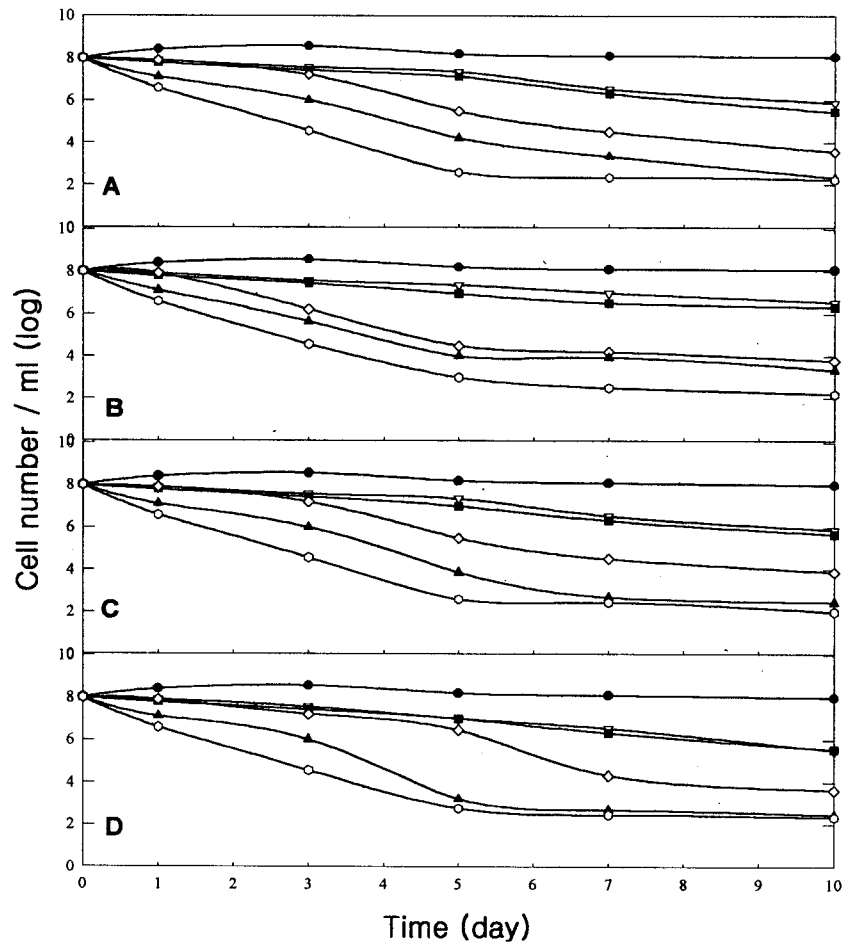


Fig. 12. The colony form unit (cfu) of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* for methylparaben using broth dilution method. (A:*E.coli*, B:*P.aeruginosa*, C:*S.aureus*, D:*B.subtilis*, ●:0.0wt%, ▽:0.1wt%, ■:0.2wt%, ◇:0.4wt%, ▲:0.8wt%, ◻:1.0wt%).

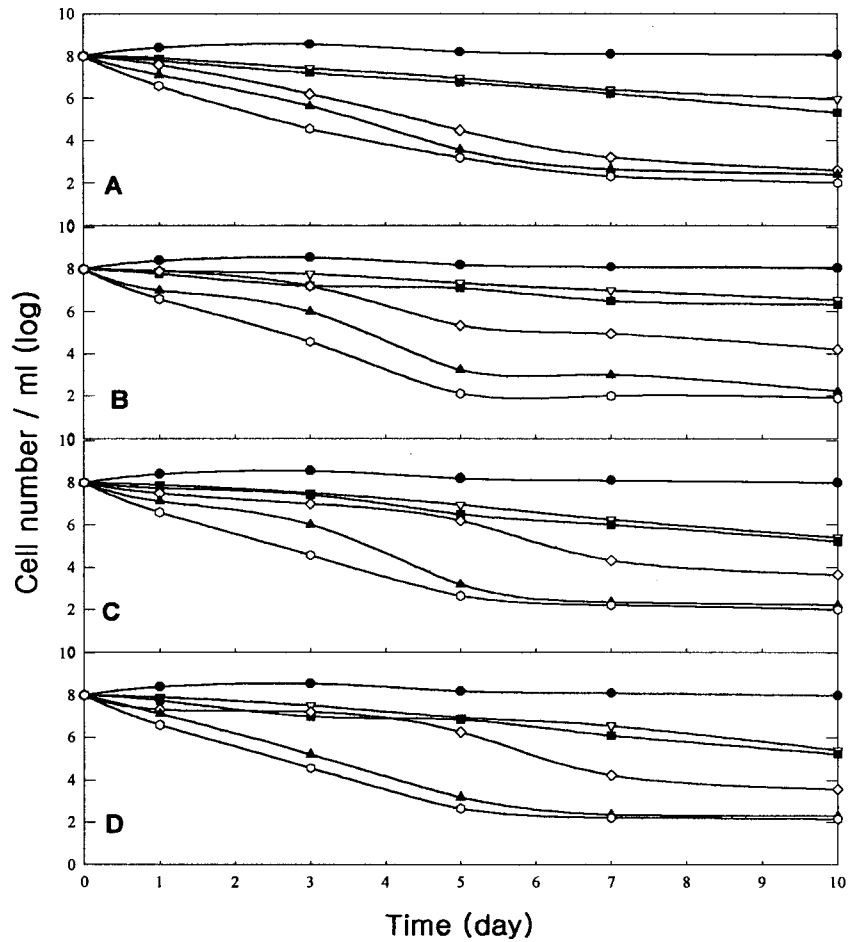


Fig. 13. The colony form unit (cfu) of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* butylparaben using broth dilution method. (A:*E.coli*, B:*P.aeruginosa*, C:*S.aureus*, D:*B.subtilis*, ●:0.0wt%, ▽:0.1wt%, ■:0.2wt%, ◇:0.4wt%, ▲:0.8wt%, ○:1.0wt%).

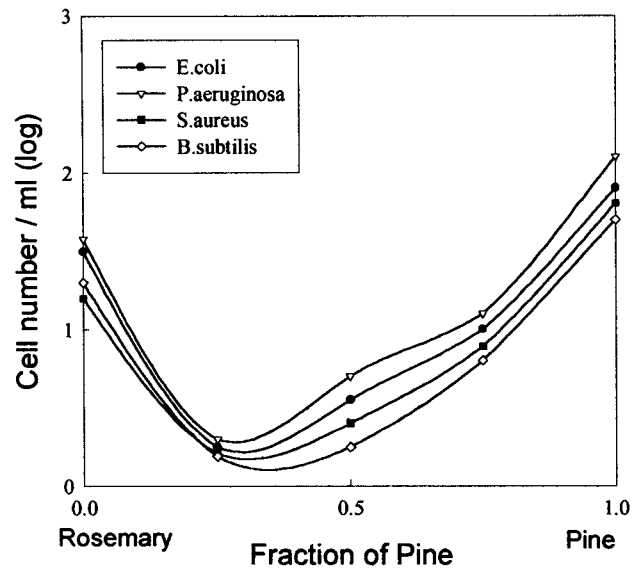


Fig. 14. The colony form unit (cfu) of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* for the mixtures of rosemary and pine.